

部分丛生竹同工酶的研究*

方 伟 童再康 许世亮

(浙江林学院, 临安 311300)

A STUDY ON ISOZYME FROM SOME CAESPITOSE BAMBOOS

FANG WEI TONG ZAI-KANG XU SHI-LIANG

(Zhejiang Forestry College, Linan 311300)

Abstract The peroxidase, esterase and glutamic-oxalacetic transaminase isozymes (POD, EST and GOT) in leaves of twenty-eight species belonging to 5 genera were analysed by means of polyacrylamide gel electrophoresis. The results show as follows: The zymograms of glutamic oxalacetic transaminase isozyme are generally stable and therefore useful in distinguishing genera. The POD and EST isozymes vary among species and may be used as reference basis for distinguishing species. Based on the zymograms of three enzymes and similarity coefficients analysis, combined with classic systematic data authors suggest that isoenzymatic data be valuable in solving some systematic problems of caespitose bamboos.

Key words Caespitose bamboos; Isozyme; Similar coefficient

摘要 本文采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定了 5 属 28 种竹叶的谷氨酸草酰乙酸转氨酶(GOT)、过氧化物酶(POD)和酯酶(EST)三种同工酶。测定结果表明, GOT 同工酶比较稳定, 对于竹子分属有较好的意义; POD 与 EST 同工酶种间分化大, 可作为竹子分种的参考依据。根据三种同工酶的酶谱及相似系数分析, 结合经典分类, 对丛生竹分类中存在的疑难问题提出了一些参考意见。

关键词 丛生竹; 同工酶; 相似系数

由于竹类植物很少开花结实, 种间差异又小, 给竹子分类带来很多困难, 在丛生竹分类中也存在许多不同的学术观点。开展对丛生竹同工酶的研究, 一方面可以填补丛生竹同工酶研究的空白, 另一方面可以为竹子分类与系统发育提供新的依据。到目前为止, 国内已有少数学者开展了对散生竹同工酶的研究。如黄敏仁等(1983)研究了同工酶在刚竹属 *Phyllostachys* 竹种鉴定上的应用; 李升峰(1989)对北美箭竹族 *Arundinarieae* 8 属 16 种散生竹的同工酶进行了研究。这次我们选择了 5 属 28 种丛生竹, 研究了谷氨酸草酰乙

* 国家自然科学基金资助项目。

1990.08.24.收稿。

酸转氨酶、过氧化物酶和酯酶三种同工酶, 试图利用酶谱分析并结合其他分类手段帮助解决丛生竹分类中的一些疑难问题, 为竹子分类提供新的途径。

材料和方法

1989年5月10日从舟山丛生竹种园采集5属28种丛生竹竹叶(见附录), 每种取40—50张叶放入塑料袋内, 密封带回后立即放入冰箱备用。凭证标本藏浙江林学院竹类标本室。

取干净的鲜竹叶, 每种竹叶称取1g, 剪碎后放入研钵中, 加入5ml磷酸提取液, 磨成匀浆状, 在8000r/min下离心10—15min, 取上清液作为样液置于冰箱中备用。

同工酶的分离用聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳(Davis 1964); 分离胶7.5%, pH8.9; 隔离板2.5%, pH6.7; 电泳缓冲液为Tris-甘氨酸, pH8.3。每样格加样20 μ l, 先用40mA电泳1h, 再增加到75mA, 在4 $^{\circ}$ C冰箱中电泳, 当溴酚兰指示带离底线1cm时停止电泳。三种酶的染色基本参考 Tanksley 和 orton(1983)的方法。

实验结果与分析

各种竹叶的谷草转氨酶(GOT)、过氧化物酶(POD)、酯酶(EST)等三种酶的谱带分别见图1、2、3, 从图1、2、3可分别得出三种酶系的同工酶谱模式图(见图4)。

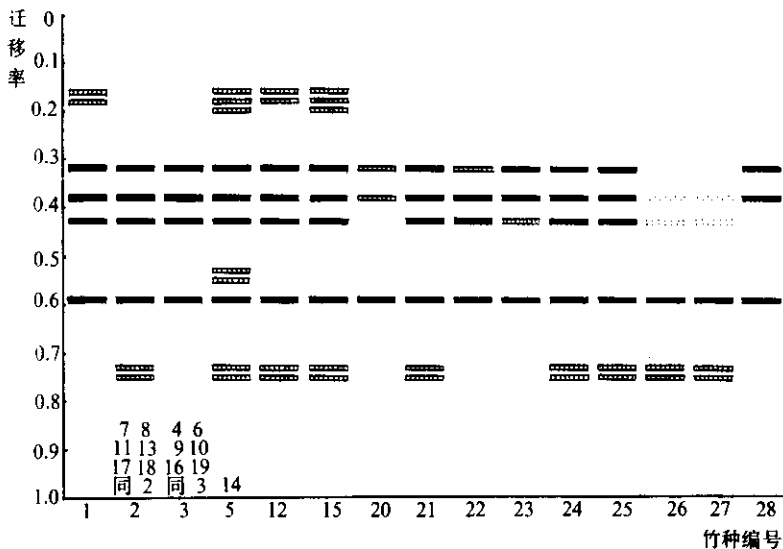


图1 28种丛生竹叶的谷氨酸草酰乙酸转氨酶(GOT)谱带

Fig1. Glutamic-oxaloacetic transaminase zymograms in the leaves of twenty-eight species of caespitose bamboos

(一)GOT 同工酶

同工酶的各条谱带非常清晰, 重复率极高, 28种丛生竹中共出现11条谱带(各竹种3—11条不等)。可分成4个染色区, A区(慢带区)和D区(快带区)的5条带色浅; B区3条带的迁移率分别为0.32、0.38、0.44, 是丛生竹区别于散生竹的特征带, 也是属级分化的

特征带; C 区共三条带, 其中 C_3 ($R_f=0.59$) 是竹类共有的带。

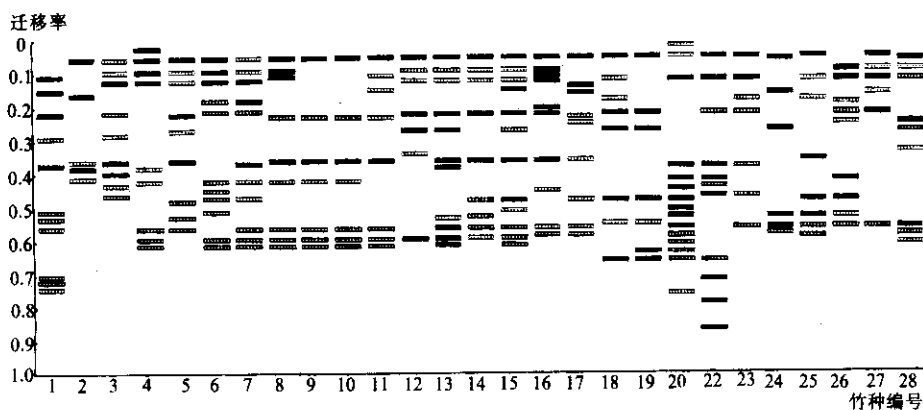


图 2 丛生竹叶的过氧化物酶(POD)谱带

Fig.2 Peroxidase zymograms in the leaves of some caespitose bamboos

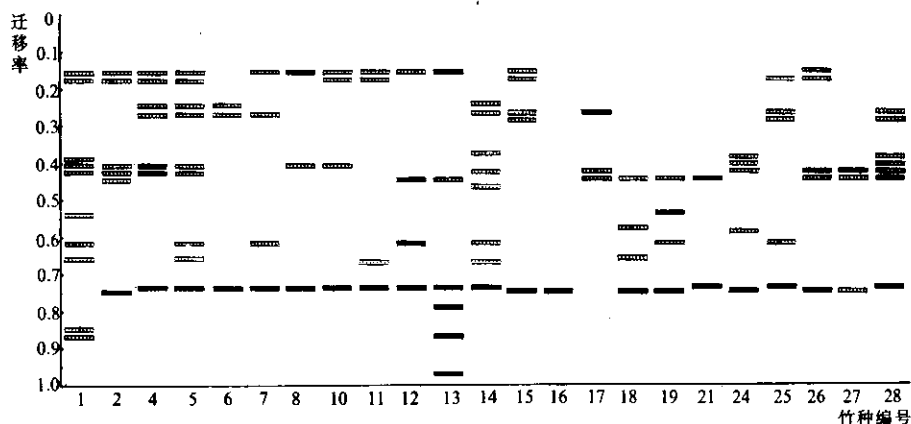


图 3 丛生竹叶的酯酶(EST)同工酶谱带

Fig.3 Esterase zymograms in the leaves of some caespitose bamboos

箬竹属 *Bambusa* 19 个种除都具有 C_3 带之外, 还具有 B_1 、 B_2 、 B_3 三条特征带, 而且都是清晰的窄型一级带。其中花竹(学名见附录, 下同)、青皮竹、长毛米筛竹、花孝顺竹、凤尾竹、撑篙竹、佛竹等竹种的谱带十分相似, 具 B_1 、 B_2 、 B_3 、 C_3 四条清晰的窄型一级带; 油箬竹、米筛竹、孝顺竹、普陀孝顺竹、妈竹、黄金间碧玉竹等 6 个竹种与花竹等的谱带基本相似, 除具 B_1 、 B_2 、 B_3 、 C_3 带外, 仅多 D_1 、 D_2 两条色浅的窄型二级带, 充分体现了箬竹属大部分竹种的谱带特征。此外, A 区的三条带只出现在该属的其他少数竹种中, 如青秆竹与崖州竹在箬竹属中谱带数为最多, 所有的 GOT 谱带均具备。而慈竹属 *Neosinocalamus* 在丛生竹各属中最为特殊, 其 B_1 、 B_2 、 B_3 带几乎不存在(仅 B_2 、 B_3 带略见微弱的扩散)。绿竹属 *Dendrocalamopsis* 与单竹属 *Lingnania* 中的部分竹种难以从箬竹属中分开, 与箬竹属竹种谱带颇为相似, 可见其亲缘关系相当接近。单竹属中 B_1 、 B_2 、 B_3

三条带有变化,其中粉单竹 B_3 带缺, B_1 、 B_2 两条带为窄型二级带,甲竹的 B_1 带与油竹的 B_3 带为窄型二级带,三种可明显区别开。麻竹为牡竹属 *Dendrocalamus* 竹种,缺少 B_3 带,可区别于箬竹属与慈竹属等其他丛生竹属。

(二)POD 同工酶

从模式图(见图 4)可见 POD 同工酶共有 48 条谱带,说明在丛生竹叶中 POD 同工酶比较丰富,各种间(也包括变种)已在 POD 同工酶上发生明显的分化。在所做的竹种中以油箬竹谱带数为最少(5 条),粉单竹最多(15 条)。48 条带可分成 3 个染色区,其中慢区(A 区)有 12 条, A_2 、 A_4 和 A_6 为该区的特征带,种间出现的频率为 0.50—0.85; B 区有 21 条带, B_2 、 B_{10} 、 B_{15} 和 B_{21} 为该区的特征带;快区(C 区)有 15 条带, C_4 、 C_6 、 C_7 和 C_2 是特征带。POD 同工酶在种间的变化大,从直观看来用来分属有困难,而用于属内种间的亲缘关系判别则优于 GOT 同工酶。

(三)EST 同工酶

从模式图(见图 4)看,所做的 23 种丛生竹共具有 23 条谱带,但谱带数在种间变化很大,如撑篙竹最为特殊,只有一条清晰谱带,而箬竹多达 10 条。这 23 条谱带可划分为 4 个染色区,慢带区(A 区)谱带色较浅, A_1 、 A_2 和 A_4 出现的频率较高,为该区的特征谱带; B 区大多数谱带都较浅, B_4 、 B_5 和 B_3 出现的频率很高,为特征谱带; C 区各种谱带数少,而且色浅,只有 C_4 频率高些; D 区是竹类最主要的谱带区,尤其是 D_1 和 D_2 带,色最浓,而且为极大多数种所共有,其 Rf 值分别为 0.74 和 0.75,在散生竹类中也具有 D_1 、 D_2 带。

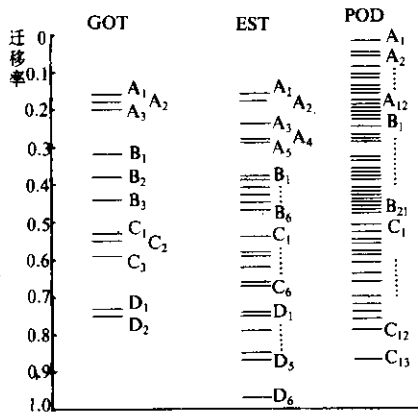


图 4 三种酶系同工酶谱模式图

Fig.4 The diagrammatic zymogram of three enzymes

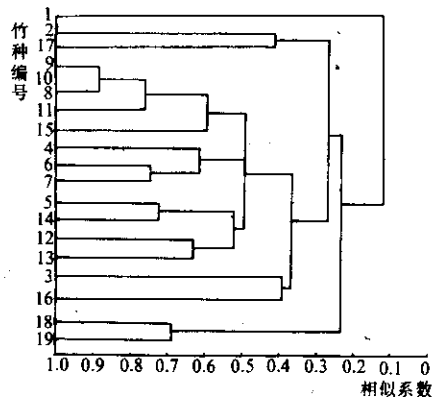


图 5 POD+EST 的箬竹属系统聚类图

Fig.5 Dendrogram based on peroxidase and esterase zymograms of bamboos

(四)箬竹属几种同工酶的相似系数分析

本次实验所做的丛生竹中以箬竹属竹种为最多,共有 18 种(包括变种变型)。通过对箬竹属各种间同工酶相似系数的计算表明,亲缘关系越近,相似系数越大(见表 1)。如长毛米筛竹为米筛竹的变种,这两者的 POD 相似系数高达 0.82,两种酶(EST+POD)谱带

合并的相似系数为 0.77; 孝顺竹类竹种之间的相似系数也很高, 如孝顺竹与凤尾竹、普陀孝顺竹的 POD 相似系数都为 0.88, 花孝顺竹与凤尾竹、普陀孝顺竹的 POD 相似系数分别为 1.00、0.80, 凤尾竹与普陀孝顺竹的 POD 相似系数为 0.80, 两种酶 (EST+POD) 谱带合并后的相似系数为 0.87, 故凤尾竹仍应置于孝顺竹下, 不宜将其提升到种级位置。崖州竹为青皮竹的变种, 它们的 EST 相似系数高达 0.88。在箬竹属中尚有一些竹种如米筛竹和青皮竹、鱼肚脯竹与青皮竹、鱼肚脯竹与崖州竹、崖州竹与青秆竹、鱼肚脯竹与青秆竹、信宜石竹与鱼肚脯竹、信宜石竹与青秆竹、黄金间碧玉竹与佛竹的 POD 相似系数均在 0.70 以上; 扁竹与米筛竹的 EST 相似系数也在 0.70 以上。而这些相似程度高的大部分竹种抗寒性都表现比较强, 如孝顺竹类 (包括孝顺竹、凤尾竹、花孝顺竹等)、崖州竹与青皮竹、米筛竹与长毛米筛竹、信宜石竹与鱼肚脯竹等竹种, 只有黄金间碧玉竹与佛竹这两种观赏竹种的抗寒性能略差一些。

表 1 EST+POD 的箬竹属各种间相似系数

Table 1 Similarity coefficients of the peroxidase and esterase zymograms between the species of bamboos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
2	0.13																	
3	0	0.29																
4	0.22	0.46	0.33															
5	0.46	0.41	0.44	0.65														
6	0.11	0.08	0.40	0.60	0.38													
7	0.28	0.23	0.40	0.65	0.48	0.76												
8	0.18	0.26	0.33	0.64	0.47	0.46	0.59											
9	0.11	0.33	0.25	0.63	0.38	0.44	0.56	0.88										
10	0.25	0.45	0.25	0.59	0.48	0.40	0.54	0.87	1.00									
11	0.30	0.35	0.24	0.50	0.40	0.31	0.52	0.75	0.80	0.78								
12	0.19	0.27	0.38	0.44	0.55	0.40	0.54	0.43	0.29	0.36	0.35							
13	0.11	0.36	0.40	0.55	0.57	0.39	0.50	0.55	0.56	0.50	0.48	0.64						
14	0.26	0.21	0.44	0.48	0.74	0.45	0.56	0.41	0.50	0.36	0.41	0.50	0.53					
15	0.32	0.37	0.40	0.56	0.65	0.47	0.45	0.50	0.67	0.59	0.64	0.52	0.61	0.55				
16	0.13	0.27	0.42	0.30	0.41	0.32	0.38	0.43	0.35	0.27	0.26	0.36	0.43	0.43	0.52			
17	0.06	0.43	0.11	0.21	0.40	0.15	0.30	0.33	0.50	0.35	0.33	0.17	0.28	0.41	0.36	0.35		
18	0.12	0.26	0.24	0.14	0.40	0.23	0.22	0.08	0.13	0.09	0.08	0.43	0.34	0.28	0.36	0.26	0.25	
19	0.19	0.27	0.13	0.07	0.34	0.08	0.15	0.09	0.14	0.09	0.09	0.45	0.29	0.29	0.37	0.27	0.26	0.70

参照 POD 与 EST 谱带的相似系数, 得到 POD+EST 的箬竹属系统聚类图 (见图 5)。从图中可看出箬竹亚属两种 (箬竹与油箬竹) 与其他孝顺竹亚属竹种亲缘关系均较远, EST+POD 相似系数不超过 0.46, 大部分在 0.10—0.30 之间。如果在相似系数 0.70 处画一虚线, 则孝顺竹与花孝顺竹、凤尾竹、普陀孝顺竹, 米筛竹与长毛米筛竹, 崖州竹与青皮竹, 扁竹与鱼肚脯竹, 黄金间碧玉竹与佛竹等竹种都表现出非常紧密的亲缘关系。

讨 论

从以上三种同工酶的分析结果来看,以 GOT 同工酶最为稳定,不仅在不同竹属间有明显的规律,充分反映出各自属的特征,而且在同一属内的亲近种之间也呈现一定的变化规律,所以可作为丛生竹属种鉴定的主要依据之一。POD 同工酶与 EST 同工酶谱带变化相对较复杂,尤其是 EST 同工酶,因种间分化大,难以反映属间的差异和亲缘关系,但在不同种间,则正好利用这种分化来区别。现以 GOT 同工酶为主,结合 POD 同工酶,参考 EST 同工酶作以下讨论。

(一) 箬竹属竹种均具 B_1 、 B_2 、 B_3 、 C_3 (GOT) 四条清晰的窄型一级带,在所做的 18 个竹种中无一例外。另外单竹属的单竹也与箬竹属谱带(特别是与孝顺竹、妈竹等一类竹种)完全相似,结合它的外部形态特征与解剖特征(单竹的竹秆维管束类型与箬竹属竹种也很相似),应该将此种划归箬竹属。

(二) 单竹属与箬竹属的 GOT 谱带相比,在 B_1 、 B_2 、 B_3 、 C_3 四条谱带中总有 1—2 条不清晰甚至缺少,故与箬竹属明显有别。从酶谱分析结果来看,该属仍应成立。除单竹应归入箬竹属外,粉单竹缺 B_3 带,且 B_1 、 B_2 带不清晰,甲竹 B_1 带不清晰,油竹 B_3 带不清晰,故后三种仍可区别开来。

(三) 慈竹属的 GOT 谱带很特殊,与箬竹属谱带完全不同,仅具有 C_3 一条清晰的窄型一级带,另具 D_1 、 D_2 二条浅色的窄型二级带, B_1 带缺, B_2 、 B_3 带仅具微弱的扩散;另外与单竹属谱带也不相同,所以从酶谱分析结果来看,慈竹一类不宜并入箬竹属,也不能并入单竹属,既然原慈竹属 *Sinocalamus* 的模式种麻竹已归入牡竹属,故将慈竹一类另立新慈竹属 *Neosinocalamus* 是合适的。

(四) 麻竹谱带与以上几属概不相同,由于该种无鳞被,小穗轴坚硬而不具关节,雌蕊的柱头通常单一等特征,学术界已将其划归牡竹属。从其谱带特征与外部形态特征来看,麻竹与其他箬竹族的竹属特征不同,将其置入牡竹属是可取的(贾良智 1980; 耿伯介 1981)。

(五) 绿竹与吊丝单竹的 GOT 谱带类型与箬竹属基本一致,特别是与孝顺竹、妈竹等部分箬竹属竹种的 GOT 谱带完全相似。如果仅从谱带特征来看,绿竹与吊丝单竹等不应另立一属,而仍应并入箬竹属为妥。

(六) 凤尾竹与孝顺竹的 POD 相似系数为 0.88, EST 相似系数为 0.86,在 27 种丛生竹中相似程度仅次于孝顺竹与花孝顺竹。因此从其谱带特征与秆箨形态来看,凤尾竹仍应置于孝顺竹下,而不应将其提升到种级位置。

根据我们对 40 多种散生竹同工酶谱带的研究结果表明,它们的 GOT 谱带不具有丛生竹中所出现的 B_1 、 B_2 、 B_3 三条清晰的窄型一级带(迁移率分别为 0.32、0.38、0.43),而 C_3 带(迁移率为 0.63)在丛生竹与散生竹中皆有,可说是竹亚科的特征谱带。

附录:材料均来源于浙江定海(除孝顺竹来源于浙江临安),山凹栽培。

Appendix: The materials are from Dinghai, Zhejiang Province, China (except *B. glauca*, which is from Linan, Zhejiang Province, China).

1. 箬竹 *Bambusa blumeana*, 许世亮等 89511。2. 油箬竹 *B. lapidea*, 许世亮等 89534。3. 花竹 *B. dolichomerithalla*,

许世亮等 89501。4. 青皮竹 *B. textilis*, 许世亮等 89504。5. 崖州竹 *B. textilis* var. *gracilis*, 许世亮等 89522。6. 长毛米筛竹 *B. pachinensis* var. *hirsutissima*, 许世亮等 89505。7. 米筛竹 *B. pachinensis*, 许世亮等 89506。8. 孝顺竹 *B. glaucescens*, 方伟等 89541。9. 花孝顺竹 *B. glaucescens* f. *alphonsokarii*, 许世亮等 89507。10. 凤尾竹 *B. glaucescens* var. *rivererum*, 许世亮等 89508。11. 普陀孝顺竹 *B. glaucescens* var. *lutea*, 许世亮等 89509。12. 扁竹 *B. basihirsuta*, 许世亮等 89512。13. 鱼肚脯竹 *B. gibboides*, 许世亮等 89513。14. 青秆竹 *B. tuldoidea*, 许世亮等 89519。15. 信宜石竹 *B. subtruncata*, 许世亮等 89524。16. 撑篙竹 *B. pervariabilis*, 许世亮等 89531。17. 妈竹 *B. boniopsis*, 许世亮等 89532。18. 黄金间碧玉竹 *B. vulgaris* var. *vittata*, 许世亮等 89538。19. 佛竹 *B. ventricosa*, 许世亮等 89539。20. 粉单竹 *Lingnania chungii*, 许世亮等 89502。21. 单竹 *L. cerosissima*, 许世亮等 89526。22. 甲竹 *L. remotiflora*, 许世亮等 89521。23. 油竹 *L. surrecta*, 许世亮等 89527。24. 绿竹 *Dendrocalamopsis oldhami*, 许世亮等 89536。25. 吊丝单竹 *D. vario-striatus*, 许世亮等 89525。26. 慈竹 *Neosinocalamus affinis*, 许世亮等 89503。27. 大琴丝竹 *N. affinis* f. *flavidorivens*, 许世亮等 89529。28. 麻竹 *Dendrocalamus latiflorus*, 许世亮等 89514。

参 考 文 献

- [1] 李升峰, 1989: 同工酶在青篱竹族分类中的应用。竹子研究汇刊, 8(4): 12—21。
- [2] 贾良智、冯学琳, 1980: 关于慈竹属与单竹属的讨论。植物分类学报, 18(2): 211—216。
- [3] 耿伯介, 1981: 对《关于慈竹属和单竹属的讨论》一文的意见。植物分类学报, 19(1): 140—142。
- [4] 黄敏仁、陈道明、许农, 1983: 同工酶在刚竹属竹种鉴别上的应用。竹类研究, 2(1): 132—134。
- [5] Davis, 1964: Disc electrophoresis, Method and application to human serum proteins. *Annals N.Y. Acad. Sci.* 121: 404。
- [6] Tanksley, S.D. and Orton, T.J. 1983: *Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A*. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam. 467—511。